

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DES

S (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00, C12N 15/26, C07K 14/55, C12N 15/12, C07K 14/745</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/55639 (43) Date de publication internationale: 10 décembre 1998 (10.12.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01105 (22) Date de dépôt international: 2 juin 1998 (02.06.98) (30) Données relatives à la priorité: 97 06757 2 juin 1997 (02.06.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR], 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). LEROY, Pierre [FR/FR]; 4, rue des Dentelles, F-67000 Strasbourg (FR). MICHOU, Anne-Isabelle [FR/AT]; Baumgasse 25/11, A-1030 Wien (AT). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRAL VECTORS COMPRISING A SPLICING SEQUENCE

(54) Titre: VECTEURS ADENOVIRAUX RECOMBINANTS COMPRENANT UNE SEQUENCE D'ÉPISSAGE

(57) Abstract

The invention concerns a recombinant adenoviral vector deriving from an adenovirus genome at least by deleting all or part of the E1 region, said adenoviral vector comprising an expression cassette of a gene of interest placed under the control of elements necessary for its expression in a host cell or a host organism, said elements required for its expression including at least a splicing sequence. The invention is characterised in that said splicing sequence is derived from a eukaryotic nuclear gene selected among the ovalbumin genes, α or β -globine, collagen and factor VIII of mammals or a synthetic splicing sequence. The invention also concerns a host cell and an infectious viral particle comprising such a vector, a method for preparing such a particle and their therapeutic or prophylactic use. The invention further concerns a pharmaceutical composition containing said adenoviral vector, said host cell or said viral particle.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un vecteur adénoviral recombinant dérivant du génome d'un adénovirus au moins par délétion de tout ou partie de la région E1, ledit vecteur adénoviral comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte, lesdits éléments nécessaires à l'expression comprenant au moins une séquence d'épissage, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage dérive d'un gène nucléaire eucaryote sélectionné parmi les gènes ovalbumine, α ou β -globine, collagène et facteur VIII de mammifères ou d'une séquence d'épissage synthétique. Elle concerne également une cellule hôte et une particule virale infectieuse comprenant un tel vecteur, un procédé de préparation d'une telle particule ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Enfin elle a trait à une composition pharmaceutique renfermant ledit vecteur adénoviral, ladite cellule ou ladite particule virale.

NO
TRANSLATION
LODGED

vecteurs adénoviraux recombinants comprenant une séquence d'épissage

La présente invention concerne des vecteurs adénoviraux comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments
5 nécessaires à son expression et comprenant des séquences d'épissage. Leur présence permet d'augmenter sensiblement l'expression du gène thérapeutique dans une cellule ou un organisme hôte. Elle a également pour objet les cellules et les particules virales infectieuses contenant ces nouveaux vecteurs ainsi qu'une méthode pour les préparer. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des
10 perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique dans une cellule ou un organisme hôte. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats-Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine
15 Désaminase (ADA). Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de cette technologie pour diverses maladies aussi bien génétiques (dans le but de corriger le dysfonctionnement d'un gène défectueux) qu'acquises (maladies infectieuses, cancers...). A l'heure actuelle, la majorité des protocoles mettent en oeuvre des vecteurs rétroviraux pour transférer et exprimer
20 le gène thérapeutique dans les cellules à traiter. Cependant, outre leur capacité restreinte de clonage, ils présentent deux inconvénients majeurs qui limitent leur utilisation systématique : d'une part, ils infectent majoritairement les cellules en division et d'autre part, du fait de leur intégration au hasard dans le génome de la cellule hôte, le risque de mutagenèse insertionnelle n'est pas négligeable. C'est
25 pourquoi, de nombreuses équipes scientifiques se sont attachées à développer d'autres types de vecteurs, parmi lesquels les adénovirus.

Mis en évidence dans de nombreuses espèces animales, les adénovirus sont peu pathogènes, non intégratifs et se répliquent aussi bien dans les cellules en division que quiescentes. De plus, ils présentent un large spectre d'hôte et sont
30 capables d'infecter un grand nombre de types cellulaires, notamment les cellules épithéliales, endothéliales, les myocytes, les hépatocytes, les cellules nerveuses et

les synoviocytes. En outre, ils possèdent un tropisme naturel pour les voies respiratoires. Ces propriétés particulières font des adénovirus des vecteurs de choix pour de nombreuses applications thérapeutiques et même vaccinales.

D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule
5 d'ADN linéaire et bicaténaire et d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de gènes codant pour les protéines virales et à ses extrémités deux répétitions inversées (désignées ITR pour Inverted Terminal Repeat) et la région d'encapsulation. Les gènes précoces nécessaires à la replication virale sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome (E1 à E4 ; E pour early en anglais)
10 comportant 6 unités transcriptionnelles munies de leur propre promoteur. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) codant pour les protéines de structure, recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais) (voir Figure 1).

15 Les vecteurs adénoviraux actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont des vecteurs dits de première génération dépourvus de la majeure partie de la région E1 essentielle à la replication, afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. La délétion de la région E3 non essentielle permet d'accroître leur capacité de clonage. Les gènes d'intérêt
20 sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région délétée. Ces virus défectifs pour la replication peuvent être propagés dans une lignée cellulaire complétant la fonction E1. On utilise couramment la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). La délétion de la région E3 non essentielle ne nécessite pas de
25 complémentation particulière. Si la faisabilité du transfert de gènes en utilisant ces vecteurs de première génération est maintenant bien établie, la question de leur innocuité reste posée. Outre les aspects de sécurité (risque de générer des particules compétentes pour la replication), se pose le problème de leur toxicité. En effet, les premiers essais cliniques ont mis en évidence l'induction de réponses
30 inflammatoires dues à l'expression des gènes viraux chez l'hôte s'opposant à la

persistance des cellules transduites et à l'expression du transgène. Ces inconvénients liés à la stimulation du système immunitaire de l'hôte par les épitopes adénoviraux ont justifié la construction de virus de nouvelles générations.

La conception d'un vecteur adénoviral repose d'une part sur le squelette viral et, d'autre part, sur la cassette d'expression du gène thérapeutique associé à des éléments de régulation permettant une expression optimale dans la cellule hôte. Sur le premier point, les vecteurs adénoviraux de seconde génération conservent les régions *en cis* ITRs et séquences d'encapsidation et comportent des délétions internes importantes visant à supprimer l'essentiel des gènes viraux dont l'expression *in vivo* n'est pas souhaitable (voir la demande internationale WO94/28152). Leur propagation est assurée par l'intermédiaire d'un virus auxiliaire ou de lignées cellulaires complétant les fonctions défectives. Par exemple, on utilisera une lignée dérivée de la 293 et exprimant les séquences adénovirales codant pour les protéines essentielles de E4 pour compléter un vecteur de seconde génération dont le squelette génomique est délété des régions E1, E3 et E4.

Pour ce qui est de la cassette d'expression, celle-ci comprend généralement en 5' une région promotrice dirigeant la transcription du gène situé à sa suite et, éventuellement en 3', une séquence de polyadénylation (polyA) qui contribue notamment à stabiliser le messager transcrit. Des éléments additionnels peuvent dans certains contextes améliorer l'expression. L'effet positif des séquences introniques sur l'expression génique a déjà été reporté *in vitro* (Buchman et Berg, 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 4395-4405 ; Huang et Gorman, 1990, Nucleic Acid Res. 18, 937-947), *in vivo* dans les animaux transgéniques (Brinster et al., 1988, Proc Natl. Acad. Sci. USA 85, 836-840) et plus récemment dans un contexte vecteur adénoviral de première génération (Connelly et al., 1996, Human Gene Therapy 7, 183-195). Ce document démontre que les souris traitées par un adénovirus délété des régions E1 et E3 et exprimant le facteur VIII humain produisent des niveaux 3 à 13 fois plus élevés de facteur VIII sérique lorsque l'ADN complémentaire FVIII comporte des séquences d'épissage.

- 4 -

La présente invention a pour but de mettre à la disposition du public des vecteurs adénoviraux plus efficaces du point de vue de l'expression du gène thérapeutique permettant ainsi de réduire les doses de vecteurs et d'amplifier l'effet thérapeutique. On a maintenant montré que la présence de séquences d'épissage

5 au sein du gène d'intérêt est bénéfique voire indispensable pour obtenir son expression. Cette observation est particulièrement vraie dans un contexte vecteur adénoviral de seconde génération où les niveaux d'expression des gènes thérapeutiques facteur IX (FIX) canin et interleukine-2 (IL-2) humaine, sont amplifiés d'un facteur 20 à 150 lorsque la cassette d'expression inclut lesdites

10 séquences d'épissage. Avec un vecteur de première génération, le facteur d'amplification reste significatif (2 à 3). Cette amélioration importante de l'expression génique est inattendue et ne pouvait être déduite de l'état de la technique.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral

15 dérivant du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins tout ou partie de la région E1, ledit vecteur adénoviral comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte, lesdits éléments nécessaires à l'expression comprenant au moins une séquence d'épissage, caractérisé en ce que ladite

20 séquence d'épissage dérive d'un gène nucléaire eucaryote sélectionné parmi les gènes ovalbumine, α ou β -globine, collagène et facteur VIII de mammifères ou d'une séquence d'épissage synthétique.

Au sens de la présente invention, le terme vecteur adénoviral désigne un adénovirus défectif pour la replication (incapable de replication autonome dans

25 une cellule hôte) en l'absence de toute complémentation. Le vecteur selon l'invention est modifié par rapport à l'adénovirus parental au moins dans la région E1 par délétion totale ou partielle de cette dernière. Selon un mode de réalisation avantageux, en outre l'une au moins des régions sélectionnées parmi E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 est non fonctionnelle. La non fonctionnalité peut être obtenue par

30 délétion totale ou partielle d'une ou plusieurs des régions concernées ou par

introduction de mutation(s) (délétion, addition et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides) rendant le gène adénoviral muté défectif. Ces modifications peuvent toucher les séquences codantes du génome viral ou non codantes, notamment les régions promotrices. Pour illustrer ces modes de réalisation, on peut citer la

5 mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328-339). Une délétion partielle peut consister en l'élimination de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 6 et 7, qui ne nécessitent pas de complémentation de la fonction E4 (Ketner et al., 1989, Nucleic

10 Acids Res. 17, 3037-3048). Une délétion totale de E4 couvre l'unité transcriptionnelle complète.

On indique qu'un vecteur adénoviral selon l'invention conserve les régions *en cis* du génome adénoviral à savoir les répétitions inversées terminales (ITR) et la région d'encapsidation. Leur longueur et séquence nucléotidique peuvent varier

15 d'un sérotype à l'autre. Cependant, elles peuvent être aisément isolées à partir des données de la littérature. A titre indicatif, les 458 premiers nucléotides (nt) du génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5) portent l'IRT 5' et la région d'encapsidation et les 103 derniers nt correspondent à l'ITR 3'. Avantagusement, le vecteur adénoviral selon l'invention comprend également les séquences codant

20 pour la protéine pIX à moins qu'elles ne soient complémentées par la lignée de production. Par ailleurs, il peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3. Une autre alternative consiste à conserver les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, Critical Review of

25 Immunology 10, 53-71). Dans le cadre de la présente invention, on peut avoir recours aux vecteurs dits de seconde génération de l'état de la technique (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119).

Un vecteur adénoviral selon l'invention peut également être modifié aux niveau des séquences codant pour les protéines tardives, comme l'hexon, le penton

30 ou la fibre afin de modifier l'infectivité du virion par exemple pour cibler un type

cellulaire particulier (voir par exemple la demande française FR97 04747).

Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention est choisi parmi les suivants :

- 5 (1) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E2 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de E3,
- (2) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de E3,
- (3) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de E3, et comportant une mutation
10 non fonctionnelle dans la région E2, et
- (4) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2 et E4 et, de manière optionnelle de tout ou partie de E3.
- (5) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie de la région E1 et, de manière optionnelle de tout ou partie de E3.

15 L'origine du vecteur adénoviral selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1
20 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol., 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de
25 sérotype C, notamment de type 2 ou 5. Par ailleurs, le vecteur adénoviral selon la présente invention peut être généré *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par les techniques de biologie moléculaire ou encore par recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale WO96/17070).

30 Comme indiqué précédemment, le vecteur adénoviral selon l'invention est recombinant et comporte au moins une cassette d'expression d'un gène d'intérêt

- 7 -

placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte. Préférentiellement, elle est insérée dans le vecteur adénoviral selon l'invention en remplacement d'une des régions délétées, notamment de E1. Dans le cas où l'on met en oeuvre plusieurs cassettes d'expression, elles peuvent être insérées au même endroit ou à des endroits différents du génome viral, utiliser les mêmes éléments de régulation ou des éléments différents et, éventuellement, être en orientation réverse les unes par rapport aux autres afin de minimiser les phénomènes d'interférence au niveau de l'expression génique.

La caractéristique essentielle de l'une au moins des cassettes d'expression mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention, est de comprendre au moins une séquence d'épissage. Le terme "séquence d'épissage" désigne une séquence habituellement active dans l'épissage d'une séquence intervenante (ivs) située entre deux points d'épissage, présente dans un gène nucléaire entre deux exons et absente de l'ARN messenger (ARNm) correspondant. Les exons sont les segments de séquence qui constituent l'ARNm. Ils peuvent être codants ou non-codants, notamment ceux localisés aux extrémités 5' et 3'. Les points d'épissage représentent les points frontières entre exon et ivs, le point donneur étant au début de l'ivs et le point accepteur à la fin. Ladite séquence d'épissage comprend au moins les séquences situées directement en 3' du point donneur et en 5' du point accepteur d'épissage et éventuellement une séquence de taille quelconque les séparant. Elle peut également comporter à l'une ou l'autre ou ses deux extrémités des séquences supplémentaires. On mettra de préférence en oeuvre des séquences exoniques, non codantes, intervenant directement dans le processus d'épissage et comprenant les séquences directement en 5' du point donneur et en 3' du point donneur d'épissage. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux avec un gène d'intérêt de type ADN complémentaire (ADNc). Les séquences intervenant directement dans l'épissage (sites d'épissage recouvrant la jonction exon-ivs) sont relativement bien conservées dans l'évolution et les consensus divulgués dans la plupart des ouvrages de base traitant de l'expression des gènes

eucaryotes (par exemple dans Watson et al., 1989, in *Molecular Biology of the Gene*, 4 ed, p 683-742, Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park, Californie). Notamment, les séquences GT et AG situées respectivement en aval et en amont des points d'épissage 5' (donneur) et 3' (accepteur) sont quasi invariables.

Il est connu que de nombreux gènes eucaryotes sont constitués par une succession d'exons et d'introns. Dans le cadre de la présente invention, on a recours à une séquence d'épissage dérivant d'un gène nucléaire transcrit par une ARN polymérase II sélectionné parmi les gènes ovalbumine, α et β -globine, collagène et facteur VIII de mammifères ou d'une séquence d'épissage synthétique. Les séquences d'épissage susceptibles d'être mis en oeuvre dans la présente invention peuvent avoir des longueurs et des séquences bien différentes. Ils peut s'agir d'une séquence d'épissage native telle que trouvée dans la nature. On peut aussi employer une séquence d'épissage modifiée, notamment par la suppression d'une ou plusieurs séquences non actives dans le processus d'épissage, dans le but de réduire sa taille ou d'éliminer des séquences répétées pouvant conduire à des phénomènes de recombinaison ou des séquences de régulation susceptibles de perturber l'expression du gène d'intérêt. On peut envisager d'utiliser une séquence d'épissage chimère formée de séquences d'origines diverses. Pour illustrer cet aspect, l'intron chimère peut être formé des parties 5' et 3' de deux introns différents ou être muni d'un site donneur d'épissage et/ou d'un site accepteur d'épissage hétérologue. Il est également possible d'avoir recours à une séquence d'épissage synthétique conçu à partir des sites d'épissage consensus. Une séquence d'épissage préférée selon l'invention dérive du second intron du gène β -globine de lapin (Green et al., 1988, *Nucleic Acid Res.* 16, 369 ; Karasuyama et al., 1988, *Eur. J. Immunol.* 18, 97-104 ; Karasuyama et al., 1989, *J. Exp. Med.* 169, 13-25), ou de celle trouvée dans le plasmide pCI (Promega Corp, pCI mammalian expression vector E1731) comprenant le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène β -globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur d'épissage du gène d'une immunoglobine de

souris.

De manière préférée, un vecteur adénoviral selon l'invention comprend une séquence d'épissage homologue ou identique à tout ou partie de la séquence représentée à l'identificateur de séquence IDS 1 ou 2. Par homologue, on entend
5 une identité de séquence entre la séquence en usage dans la présente invention et celle reportée dans l'un ou l'autre des IDS d'au moins 70 %, avantageusement d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 % et, de manière tout à fait préférée d'au moins 95%. L'identité de séquence signifie 100 % d'identité et « sensiblement telle » désigne une identité de séquence d'au moins 95 %. Une partie comprend
10 au moins 17 nt continus. Un vecteur adénoviral selon l'invention comprenant une séquence d'épissage sensiblement telle que représentée à l'identificateur de séquence IDS 1 ou 2 convient tout particulièrement.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la cassette d'expression peut comporter une ou plusieurs séquences d'épissage insérées au sein
15 d'un ou plusieurs gènes d'intérêt de type génomique, minigène (type mixte entre génomique et ADNc) ou encore ADNc (dépourvu d'intron) portés par ladite cassette. Le site d'insertion préférentiel de la séquence d'épissage au sein du gène d'intérêt est entre le premier exon et le second exon. Lorsque le gène d'intérêt est de type ADNc, on aura de préférence recours à une séquence d'épissage munie de
20 courtes séquences exoniques pouvant être insérée en 5' ou en 3' de l'ADNc. Le gène d'intérêt peut être homologue ou hétérologue à la cellule hôte et coder pour un ARN antisens, un ribozyme ou un polypeptide d'intérêt de localisation nucléaire, cytoplasmique, membranaire ou sécrété. Il peut s'agir d'un polypeptide natif tel que
25 trouvé dans la nature, d'un fragment fonctionnel, d'un mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées ou encore d'une chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. Le gène d'intérêt peut être obtenu par synthèse chimique ou par clonage (criblage de banque d'ADN à l'aide de sondes appropriées, PCR...) et peut être modifié par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire.

30 Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser un gène d'intérêt codant pour une cytokine (interféron α , β ou γ , interleukine (IL),

- 10 -

notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, un facteur nécrosant des tumeurs (TNF), un facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), un récepteur cellulaire (notamment reconnu par le virus HIV), un ligand de récepteur, un facteur de coagulation, un facteur de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor...),
5 une enzyme (uréase, rénine, thrombine, métalloprotéinase, NOS pour Nitric Oxide synthétase, SOD, catalase...), un inhibiteur d'enzyme (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteur de protéase virale, PAI-1 pour plasminogen activator inhibitor...), un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou
10 II ou un polypeptide agissant sur l'expression des gènes correspondants, un polypeptide capable d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement, un polypeptide agissant positivement ou négativement sur l'apoptose (Bax, Bcl2, BclX...), un agent cytotatique (p21, p16, Rb...), une apolipoprotéine (ApoAI, ApoAIV, ApoE...), un inhibiteur d'angiogénèse
15 (angiostatine, endostatine...), un marqueur (β -galactosidase, luciférase....) ou tout autre gène d'intérêt ayant un effet thérapeutique pour l'affection ciblée.

Plus précisément, dans le but de traiter un dysfonctionnement héréditaire, on utilisera une copie fonctionnelle du gène défectueux, par exemple un gène codant pour le facteur VIII ou IX dans le cadre de l'hémophilie A ou B, la
20 dystrophine dans le cadre des myopathies de Duchenne et Becker, l'insuline dans le cadre du diabète, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) dans le cadre de la mucoviscidose. S'agissant d'inhiber l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers, on mettra de préférence en oeuvre un gène d'intérêt codant pour un ARN anti-sens, un ribozyme, un produit
25 cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique, produit d'expression des gènes de levure *FCYI* et *FURI* codant pour l'uracile phosphoribosyl transférase et la cytosine désaminase.....), un anticorps, un inhibiteur de la division cellulaire ou des signaux de transduction, un produit d'expression d'un gène suppresseur de tumeur (p53,
30 Rb, p73....), un polypeptide stimulateur du système immunitaire, un antigène

- 11 -

associé à une tumeur (MUC-1, BRCA-1, antigènes précoces ou tardifs (E6, E7, L1, L2...) d'un virus à papillome HPV....), éventuellement en combinaison avec un gène de cytokine. Enfin, dans le cadre d'une thérapie anti-HIV, on peut avoir recours à un gène codant pour un polypeptide immunoprotecteur, un épitope
5 antigénique, un anticorps (2F5; Buchacher et al., 1992, *Vaccines* 92, 191-195), le domaine extracellulaire du récepteur CD4 (sCD4 ; Trauneker et al., 1988, *Nature* 337, 84-86) une immunoadhésine (par exemple un hybride CD4-immunoglobuline IgG ; Capon et al., 1989, *Nature* 337, 525-531 ; Byrn et al., 1990, *Nature* 344, 667-670), une immunotoxine (par exemple fusion de l'anticorps 2F5 ou de
10 l'immunoadhésine CD4-2F5 à l'angiogénine ; Kurachi et al., 1985, *Biochemistry* 24, 5494-5499), un variant trans-dominant, un produit cytotoxique tel que l'un de ceux mentionné ci-dessus ou encore un IFN α ou β .

Par ailleurs, la cassette d'expression en usage dans la présente invention peut également comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou
15 identifier les cellules transfectées. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont
20 connus de l'homme de l'art.

La locution "éléments nécessaires à l'expression" désigne les éléments génétiques permettant la transcription d'un gène d'intérêt en ARN et la traduction d'un ARNm en polypeptide. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même
25 virale et peut être constitutif ou régulable. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de restriction.... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs
30 viraux CMV (Cytomégalo virus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du

virus HSV-1, précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), adénoviral d'un gène précoce ou tardif (E1A, MLP...) ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase), MT (métallothionéine), α 1-antitrypsine, CFTR, surfactant (poumon-spécifique), immunoglobuline (lymphocyte-spécifique), actine
5 (muscle-spécifique) ou encore SR α (hybride entre l'origine de SV40 et le LTR de HTLV-I ; Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 466-472). Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin.
10 Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et α -fétoprotéine surexprimée dans les
15 cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). Le promoteur précoce du Cytomégalo virus (CMV) est tout particulièrement préféré.

Lorsque la cassette d'expression en usage dans la présente invention comprend plusieurs gènes d'intérêt, ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle des mêmes éléments génétiques (cassette polycistronique utilisant un site interne
20 d'initiation de la traduction de type IRES pour réinitier la traduction du second cistron) ou d'éléments indépendants.

Bien entendu, la cassette peut en outre comprendre des éléments additionnels améliorant l'expression du gène d'intérêt (séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence de polyadénylation, IRES, leader tripartite....)
25 ou encore le maintien dans la cellule hôte (origine de répllication ...). De tels éléments sont connus de l'homme de l'art. Une séquence de polyadénylation préférée dérive du virus SV40 ou encore du gène β -globine de lapin.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux réside en un vecteur adénoviral dont le génome est délété des régions E1, E3 et E4 dans lequel est

- 13 -

insérée à la place de la région E1, une cassette d'expression comportant le promoteur CMV, la séquence d'épissage synthétique isolée du plasmide pCI, l'ADNc codant pour l'IL-2 humaine et le polyA du virus SV40 (tel que pTG6215). Une autre variante intéressante est fournie par un vecteur adénoviral de squelette

5 génomique similaire (délétion E1, E3 et E4) comprenant une cassette d'expression formée du promoteur RSV suivi des séquences d'épissage comprenant l'intron 2 du gène β -globine de lapin, de l'ADNc du facteur IX canin et du poly A du gène β -globine de lapin (tel que pTG9378). Un autre exemple préféré consiste en un vecteur E1⁻ E3⁻ dans lequel est insérée une cassette le promoteur CMV, l'intron

10 synthétique de pCI, l'ADNc codant pour l'IL-2 humaine suivi du polyA de SV40 (tel que pTG6624).

L'invention a également trait à une particule virale infectieuse ainsi qu'à une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de

15 préférence, une cellule humaine et peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée ou non dans le génome. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage ...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste ...), cardiaque, hépatique, pulmonaire, trachéale, épithéliale ou fibroblaste. Une

20 particule virale infectieuse selon l'invention est préparée selon toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art (Graham et Preveet, 1991, *supra*). Plus précisément, le vecteur adénoviral selon l'invention est propagé dans une lignée de complémentation capable de fournir *en trans* les fonctions défectueuses afin de produire les polypeptides nécessaires à la constitution des particules virales

25 infectieuses. On aura notamment recours aux lignées décrites dans les demandes internationales WO94/28152 et WO 97/04119. On peut également employer une lignée cellulaire appropriée, comme la lignée 293 pour compléter la fonction E1 (Graham et al., 1977, *supra*) ou A549-E1 (WO94/28152). Pour une complémentation multiple, il est également possible de mettre en oeuvre un virus

auxiliaire ou une lignée de complémentation de l'état de la technique (par exemple Lusky et al., 1998, J. Virol 72, 2022-2033).

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention, selon

5 lequel :

- (i) on introduit ledit vecteur adénoviral selon l'invention dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- 10 (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale infectieuse, et
- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

15 Bien entendu, la particule virale infectieuse peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé
20 chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium ...).

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur adénoviral, une particule virale infectieuse ou une cellule hôte eucaryote selon l'invention en
25 association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies génétiques (hémophilie, diabète, mucoviscidose, myopathie de Duchenne ou de Becker, maladies autoimmunes...), de cancers et tumeurs, de maladies virales (l'hépatite B ou C, SIDA, infections herpétiques....), de maladies

- 15 -

cardiovasculaires (resténoses...etc).

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de
5 vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une
10 administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, les particules virales
15 selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} usf (unités formant des plages), avantageusement 10^5 et 10^{13} usf et, de préférence, 10^6 et 10^{12} usf. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Elle peut être présentée sous forme liquide ou sèche (lyophilisat...).

20 Le vecteur et les particules virales virale selon l'invention peuvent être éventuellement associée à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité. Ces substances sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman, 1996,
25 Nature Biotechnology 14, 339-342; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de protéines nucléaires ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison.

Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation d'un vecteur adénoviral,

- 16 -

d'une particule virale infectieuse ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention pour le transfert d'un gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique ...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient. L'utilisation préférée est pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

Enfin la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'invention, pour améliorer l'expression d'un gène d'intérêt d'un facteur au moins 20, avantageusement d'au moins 50 et, de préférence d'au moins 100 dans une cellule ou un organisme hôte. Le niveau d'amélioration peut être facilement déterminé en comparant l'expression du gène d'intérêt en présence et en absence de ladite séquence d'épissage dans un contexte adénoviral donné.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur adénoviral, d'une particule virale ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100) indiquant l'emplacement des différents gènes.

EXEMPLES

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

- 17 -

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise
5 un kit commercial. Les étapes de recombinaison homologue sont de préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les techniques
10 d'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans
15 la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. Dans les exemples qui suivent, on a recours aux lignées cellulaires 293
20 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573), LCA-1 (correspondant au clone 5606#5-38 décrit à l'exemple 3 de la demande WO94/04119), A549 d'origine épithéliale et dérivant d'un carcinome pulmonaire (ATCC CCL-185) et A549-E1 (exemple 6 de WO94/28156). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. On indique que la lignée A549-
25 E1 est une lignée de complémentation de la fonction adénovirale E1 obtenue par transfection d'un plasmide portant les séquences E1 d'Ad5 (nt 505 à 4034) exprimées à partir du promoteur PGK. Les clones stables sélectionnés à la puromycine sont testés pour leur capacité de complémentation et on sélectionne le meilleur clone producteur (#73).

- 18 -

EXEMPLE 1: Construction du vecteur adénoviral AdTG6215 exprimant le gène de l'interleukine 2 humaine.

5 On isole du plasmide pCI (Promega) le fragment *BglII-BamHI* portant le promoteur CMV, la séquence d'épissage, un site multiple de clonage (MCS) et la séquence polyA du virus SV40, lequel est inséré dans un plasmide conventionnel. Les séquences ADNc codant pour l'IL-2 humaine (Taniguchi et al., 1983, Nature 302, 305-311) sont isolées sous forme d'un fragment *XhoI-EcoRI* (éventuellement
10 par PCR) et introduites au niveau du MCS. La cassette est clonée en lieu et place de la région adénovirale E1 dans un vecteur de transfert adénoviral, pour donner pTG6601. Le vecteur de transfert comporte les nt 1 à 458 et 3329 à 6241 de l'Ad5 dans un plasmide ppolyII. On génère pTG6215 par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-BstEII* isolé de pTG6601 et le vecteur pTG8595 (Chartier
15 et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) linéarisé par *Clal*. Le vecteur adénoviral pTG6215 contient le génome Ad5 dépourvu des régions E1 (nt 459 à 3327), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et la cassette "promoteur CMV-séquence d'épissage de pCI-ADNc IL-2 et pA SV40" insérée à la place des séquences adénovirales E1.

20 A titre de témoin, on génère le vecteur pTG6692 en déléant les séquences d'épissage du bloc d'expression isolé de pCI par digestion *PstI* et religation. Le clonage de l'ADNc IL-2 et l'insertion de la cassette "sans intron" au sein du génome adénoviral sont réalisés comme indiqué ci-dessus.

25 Enfin, il est utile de comparer l'effet des séquences d'épissage dans un contexte vecteur adénoviral de première génération. Pour ce faire, le vecteur pTG6624 est construit par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-BstEII* isolé de pTG6601 et le vecteur pTG4656 linéarisé par *Clal*. Ce dernier est équivalent à pTG8595 à la différence qu'il porte une région E4 intégrée, de sorte que la construction finale pTG6624 correspond au génome Ad5 délété des régions

- 19 -

E1 (nt 459 à 3327) et E3 (nt 28592 à 30470) avec la cassette "promoteur CMV-séquence d'épissage de pCI-ADNc IL-2 et pA SV40" insérée à la place de E1. Le vecteur "sans intron" de première génération désigné pTG6229, résulte de la délétion des séquences d'épissage par digestion *Pst*I et du clonage de la cassette
5 sans intron dans le génome adénoviral par recombinaison homologue avec le vecteur pTG4656.

Les adénovirus AdTG6215 et AdTG6692 sont obtenus par transfection du fragment *Pac*I isolé des vecteurs correspondants dans les cellules LCA1 par la technique au phosphate de calcium. Les virions de première génération
10 AdTG6624 et AdTG6229 sont produits dans la lignée 293. Les virus sont isolés, propagés et purifiés dans les conditions habituelles.

Les cellules humaines A549 sont mises en culture puis infectées à confluence par les virions précédents en respectant une multiplicité d'infection d'environ 100. Les quantités d'IL-2 secrétées dans les surnageants de culture
15 récupérés 48 h après l'infection, sont déterminées par ELISA (trousse Quantikine hIL-2, R&D System, Minneapolis). Dans un contexte vecteur adénoviral de seconde génération (E1⁺, E3⁺ et E4⁺), l'IL-2 est produite en des quantités 100 à 150 fois plus élevées lorsque les virions portent une cassette d'expression munie d'un intron (AdTG6215) que lorsqu'ils en sont dépourvus (AdTG6692). Ces dernier
20 synthétisent des niveaux d'IL-2 très faibles qui ne permettent pas d'envisager leur utilisation thérapeutique. En comparaison, le facteur d'amplification dans un contexte de virus de première génération (E1⁺, E3⁺) est de 2,5.

25 **EXEMPLE 2 :** Construction du vecteur adénoviral AdTG9378 exprimant le gène codant pour le facteur IX canin.

Dans un premier temps, on reconstitue la cassette recombinante constituée du promoteur RSV, de la séquence d'épissage du second intron du gène β -globine de lapin placée en 5' de l'ADNc du FIX canin suivi du polyA du gène β -globine

- 20 -

de lapin. Les séquences d'épissage et polyA β -globine sont excisées du vecteur pBCMGNeo (Karasuyama et al., 1989, *supra*) par digestion *SalI*-*Bam*HI et clonées en aval du promoteur RSV porté par le fragment *SalI*-*Bam*HI isolé du vecteur pREP4 (Invitrogen V004-50). Puis on insère en aval des séquences d'épissage, l'ADNc codant pour le FIX canin dont la séquence est décrite dans Evans et al. (1989, Blood 74, 207-212). L'unité de transcription est placée dans un vecteur de transfert qui contient les séquences Ad5 1 à 458 et 3328 à 5778, pour donner pTG9350. Le vecteur adénoviral pTG9378 est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *PacI*-*Bgl*II isolé de pTG9350 et le vecteur pTG8595 (Chartier et al., 1996, *supra*) linéarisé par *Cla*I. Il contient le génome Ad5 dépourvu des régions E1 (nt 459 à 3327), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et la cassette FIX indiquée ci-dessus insérée en lieu et place de E1.

Comme précédemment, on construit un témoin désigné pTG5666 dont l'ossature adénovirale correspond à un vecteur de seconde génération mais dans lequel la cassette FIX est dépourvue de séquences d'épissage, par digestion *Pst*RI.

De même, on construit deux vecteurs de première génération pTG9370 et pTG9383 différant respectivement par la présence ou non de l'intron 2 β -globine dans la cassette FIX. Le premier est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *PacI*-*Bgl*II isolé de pTG9350 et le vecteur pTG4656 délété des régions E1 (nt 459 à 3327) et E3 (28592 à 30470), linéarisé par *Cla*I. Le second résulte de la recombinaison entre le fragment *PacI*-*Bgl*II dépourvu d'intron et pTG4656.

Les particules virales sont générées par transfection des fragments *PacI* des plasmides précédents dans les lignées 293 (AdTG9370 et AdTG9383) ou LCA1 (AdTG9378 et AdTG5666). Les virus sont isolés, propagés et purifiés dans les conditions habituelles. Les cellules cibles A549 sont mises en culture puis, une fois à confluence, infectées par les virions précédents en respectant une multiplicité d'infection d'environ 100. Les quantités de FIX canins secrétées dans les surnageants de culture récupérés 48 h après l'infection sont déterminées par ELISA (voir par exemple Axelrod et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87,

5173-5177 ; Roman et al., 1992, Somat. Cell Mol. Genet. 18, 247-258 ;
Miyano-hara et al., 1992, New Biol. 4, 238-246 ; Lozier et al., 1994, JAMA 271,
47-51). Un test particulièrement approprié utilise à titre d'anticorps de capture, le
monoclonal FXCOO8 (Bajaj et al., 1985, J. Biol. Chem. 260, 11574-11580) à
raison de 200 ng par puits et à titre d'anticorps de détection, un anticorps de lapin
spécifique du FIX humain (STAGO) couplé à la peroxydase. La sécrétion de FIX
canin dans les cellules A549 infectées par les virus de seconde génération est 20
fois plus élevée lorsque la cassette comporte des séquences d'épissage
(AdTG9378) que lorsqu'elle en est dépourvue (AdTG5666). Lorsque la
transduction met en oeuvre des vecteurs de première génération, l'effet bénéfique
de l'intron est moins marqué (facteur d'amplification d'environ 2,5).

Le remplacement de l'ADNc du FIX par celui codant pour l'IL-2 humaine
donne lieu au vecteur pTG6214. il est l'équivalent à l'AdTG9378 à la différence
du gène d'intérêt.

EXEMPLE 3 : Effet de l'intron sur la production virale.

Environ 10^7 cellules A549-E1 #73 sont mises en culture dans des flasques
F25 et sont infectées à une MOI de 1 avec les virus AdTG6624 ($\Delta E1\Delta E3$ -intron)
ou AdTG6229 ($\Delta E1\Delta E3$ -intron). L'infection est réalisée 30 min à 37°C en milieu
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) additionné de 2 % de sérum. Les
cultures sont récoltées aux temps 24 h, 48 h, 72 h et 96 h et les virions libérés des
cellules par chocs thermiques. Le titre viral est évalué par immunofluorescence de
la protéine DBP à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique (Reich et al., 1983,
Virology 128, 480-484). Le facteur d'amplification est déterminé par le rapport
du nombre d'unités infectieuses (u.i.) finales sur initiales. On observe un facteur
d'amplification de l'ordre de 1900, 4100 et 3300 à 48, 72 et 96 h post infection
respectivement avec les deux types de constructions. Lorsque la même expérience
est conduite dans en flasques de 175 (MOI=3 et récolte à 3 jours post-infection),

- 22 -

le rendement de production (i.u./cellule) est sensiblement plus élevé (d'environ 25 %) avec les virus AdTG6624 qui comportent une cassette d'expression munie d'un intron. Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la présence de l'intron synthétique de pCI n'a pas d'effet négatif sur les rendements de production virale.

5

EXEMPLE 4 : Fonctionnalité des vecteurs *in vitro* et *in vivo*.

Divers types cellulaires aussi bien de lignées établies d'origines variées [humaine, simienne ou murine : A549, Vero et W162 (Weinberg et Ketner, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5384-5386)] que de cellules primaires de souris (fibroblastes), canines (myoblastes) et surtout d'origine humaine [tumeurs primaires issues d'un cancer de l'estomac (passage 5) et d'une métastase hépatique d'un cancer de colon (passage 2)] sont transduites de façon standard à une moi de 50 à 100. Les virus utilisés sont les suivants : AdTG6624 ($\Delta E1\Delta E3$ pCMV+intron), AdTG6229 ($\Delta E1\Delta E3$ pCMV-intron), AdTG6215 ($\Delta E1\Delta E3\Delta E4$ pCMV+intron) ou AdTG6692 ($\Delta E1\Delta E3\Delta E4$ pCMV-intron), AdTG6214 ($\Delta E1\Delta E3\Delta E4$ pRSV+intron) et son contrôle ($\Delta E1\Delta E3\Delta E4$ pRSV-intron). Les surnageants sont récoltés 24 et 72 h après l'infection et les quantités d'IL-2 sécrétées sont déterminées par ELISA comme précédemment.

20 Les dosages indiquent l'effet bénéfique de l'intron en terme de production d'IL-2, celle ci étant 2 à 3 fois plus élevée dans un contexte vecteur de première génération et plus de 100 fois dans un contexte $\Delta E1\Delta E3\Delta E4$. On note que les virions AdTG6624 sont les plus productifs en IL-2, montrant l'intérêt à associer le promoteur CMV, l'intron synthétique dans une ossature vecteur de première
25 génération.

L'activité antitumorale des virions exprimant l'IL-2 est évaluée *in vivo* dans un modèle murin de tumeurs. Des souris femelles immunodéficientes B6D2 âgées de 6 à 8 semaines sont rendues cancéreuses par administration de 3×10^5 cellules tumorales P815. Une fois les tumeurs palpables (3 à 4 mm de diamètre), on

- 23 -

inocule 5×10^3 particules infectieuses d'AdTG6624 par voie intratumorale à J0, J1 et J2 et on suit la survie des animaux au cours du temps. Le pourcentage de survie des animaux traités avec les virus AdTG6624 atteint 40 % plus de 40 jours post-infection. En comparaison, les animaux traités avec un virus contrôle contenant
5 une cassette d'expression de l'IL-2 sans intron dirigée par le promoteur MLP présentent un taux de survie beaucoup plus faible.

- 24 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: Transgene S.A.
(B) RUE: 11 rue de Moelsheim
(C) VILLE: Strasbourg
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 67082
(G) TELEPHONE: 03 88 27 91 00
(H) TELECOPIE: 03 88 27 91 11

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveaux vecteurs adenoviraux recombinants
comprenant une sequence d'epissage

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 250 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: sequence d'epissage synthétique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CTGCAGAACT TGCTCGTGAG GCACTGGGCA GSTAAGTATC AAGGTTACAA GACAGGTTTA	60
AGGAGACCAA TAGAACTGG GCTTGTGAG ACAGAGAAGA CTCTTCCGTT TCTGATAGGG	120
ACCTATTGGT CTTACTGACA TCCACTTTGC CTTTCTCTCC ACAGGTGTCC ACTCCCAGTT	180

- 25 -

CAATTACAGC TCTTAAGGCT AGAGTACTTA ATACGACTCA CTATAGGCTA GCCTCGAGGT 240
CGACCTGCAG 250

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 652 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: intron 2 beta globine de lapin

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GTGACCCGAT CCTGAGAACT TCAGGGTGAG TTTGGGGACC CTTGATTGTT CTTTCTTTTT 60
CGCTATTGTA AAATTCATGT TATATGGAGG GGGCAAAGTT TTCAGGGTGT TGTTTAGAAT 120
GGGAAGATGT CCTTGTATC ACCATGGACC CTCATGATAA TTTTGTCTTCT TTCACCTTCT 180
ACTCTGTTGA CAACCATGTT CTCCTCTTAT TTTCTTTTCA TTTTCTGTAA CTTTTTCGTT 240
AACTTTTAGC TTGCATTTGT AACGAATTTT TAAATTCAC TTTGTTTATT TGTCAGATTG 300
TAAGTACTTT CTCTAATCAC TTTTTTTTCA AGGCAATCAG GGTATATTAT ATTGTACTTC 360
AGCACAGTTT TAGAGAACAA TTGTTATAAT TAAATGATAA GGTAGAATAT TTCTGCATAT 420
AAATTCTGGC TGGCGTGGAA ATATTCTTAT TGGTAGAAAC AACTACACCC TGGTCATCAT 480
CCTGCCTTTC TCTTTATGGT TACAATGATA TACACTGTTT GAGATGAGGA TAAAATACTC 540
TGAGTCCAAA CCGGGCCCT CTGCTAACCA TGTTGATGCC TTCTTCTCTT TCCTACAGCT 600
CCTGGGCAAC GTGCTGTTG TGTGCTGTC TCATCATTTT GGCAAAGAAT TC 652

Revendications

1. Vecteur adénoviral dérivant du génome d'un adénovirus au moins par délétion de tout ou partie de la région E1, ledit vecteur adénoviral comportant une
5 cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte, lesdits éléments nécessaires à l'expression comprenant au moins une séquence d'épissage, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage dérive d'un gène nucléaire eucaryote sélectionné parmi les gènes ovalbumine, α ou
10 β -globine, collagène et facteur VIII de mammifères ou d'une séquence d'épissage synthétique.
2. Vecteur adénoviral selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage dérive de l'intron 2 du gène β -globine de lapin ou d'une
15 séquence d'épissage comprenant le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène β -globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur d'épissage du gène d'une immunoglobine de souris.
3. Vecteur adénoviral selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite
20 séquence d'épissage comprend une séquence homologue ou identique à tout ou partie de la séquence représentée à l'identificateur de séquence IDS 1 ou 2.
4. Vecteur adénoviral selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite
25 séquence d'épissage comprend une séquence sensiblement telle que représentée à l'identificateur de séquence IDS 1 ou 2.
5. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que
30 ladite séquence d'épissage est insérée dans ladite cassette d'expression entre le premier exon et le second exon du gène d'intérêt.

- 27 -

6. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage comprend à l'une et l'autre de ses extrémités une séquence exonique et est insérée dans ladite cassette d'expression en 5' ou 3' du gène d'intérêt, celui-ci étant de type ADNc.
- 5
7. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'en outre l'une ou moins des régions sélectionnées parmi E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 est non fonctionnelle.
- 10
8. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est en outre dépourvu de tout ou partie de la région E3.
9. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 8, sélectionné parmi le groupe suivant :
- 15
- (1) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E2 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3.
- (2) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3.
- 20
- (3) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3, et comportant une mutation non fonctionnelle dans la région E2, et
- (4) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2 et E4 et, de manière optionnelle de tout ou partie de la région E3.
- 25
- (5) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie de la région E1 et, de manière optionnelle de tout ou partie de la région E3.
10. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il dérive du génome d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine,
- 30
- murine ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des

- 28 -

fragments de génome adénoviral de différentes origines.

11. Vecteur adénoviral selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5.

5

12. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le gène d'intérêt code pour un ARN antisens, un ribosyme ou un polypeptide d'intérêt thérapeutique sélectionné parmi une cytokine, un récepteur cellulaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, un facteur de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un inhibiteur d'angiogénèse, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le HIV, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.

15

13. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdits éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte comprennent un promoteur, notamment sélectionné parmi les promoteurs MLP (Major Late Promoter), PGK (Phospho Glycérate Kinase), RSV (Rous sarcoma Virus), SR α et CMV (Cytomégalo virus).

20

14. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que lesdits éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte comprennent une séquence de polyadénylation, notamment dérivée du virus SV40 ou du gène β -globine de lapin.

25

15. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14.

- 30 16. Cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des

revendications 1 à 14 ou infectée par une particule virale infectieuse selon la revendication 15.

17. Procédé de préparation d'une particule virale infectieuse selon la revendication

5 15, selon lequel :

(i) on introduit un vecteur adénoviral selon l'une des revendications
1 à 14 dans une cellule de complémentation capable de
complémenter *en trans* ledit vecteur adénoviral pour obtenir une
10 cellule de complémentation transfectée ;

(ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des
conditions appropriées pour permettre la production de ladite
particule virale infectieuse ; et

15 (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture
cellulaire.

18. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou
20 prophylactique un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14,
une particule virale infectieuse selon la revendication 15 ou obtenue en
mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 17 ou une
cellule hôte eucaryote selon la revendication 16, en association avec un
support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

25

19. Utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, d'une
particule virale infectieuse selon la revendication 15 ou obtenue en mettant en
oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 17 ou d'une cellule
hôte eucaryote selon la revendication 16, pour le transfert d'un gène d'intérêt
30 dans une cellule ou un organisme hôte.

- 30 -

20. Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 15 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 17 ou d'une cellule hôte eucaryote selon la
5 revendication 16, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.
21. Utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, pour améliorer l'expression d'un gène d'intérêt d'un facteur au moins 20,
10 avantageusement d'au moins 50 et, de préférence d'au moins 100 dans une cellule ou un organisme hôte.

- Figure 1 -

